

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Šárka Danačíková

Role glykosylace ionotropních glutamátových receptorů v savcích neuronech
Role of glycosylation of ionotropic glutamate receptors in mammalian neurons

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Martin Horák, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 5. 2016

Podpis

Poděkování

Chtěla bych především poděkovat svému školiteli Mgr. Martinovi Horákovi, Ph.D. a Mgr. Martině Kaniakové, Ph.D. za odbornou konzultaci, podnětné rady a připomínky. Dále bych ráda poděkovala kolegům z oddělení Buněčné neurofyzilogie Fyziologického ústavu AV ČR, v. v. i. za vytváření příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

Glutamát je nejvíce zastoupeným excitačním neuropřenašečem v centrální nervové soustavě savců. Existují dva typy glutamátových receptorů, ionotropní a metabotropní, které se nacházejí v excitačních synapsích savců. Práce je zaměřena na ionotropní glutamátové receptory, které mají klíčovou roli v procesech učení a paměti. Hlavní subtypy ionotropních glutamátových receptorů byly označeny podle svých specifických agonistů: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionové kyseliny (AMPA), *N*-methyl-D-aspartátu (NMDA) a kainátu. Všechny typy ionotropních glutamátových receptorů, které se skládají do formy tetramerů, obsahují mnoho glykosylačních míst, které mohou být modifikovány glykany nebo monosacharidy. Glykany a monosacharidy navázané na receptory regulují klíčové procesy jako je skládání podjednotek, transport na buněčný povrch nebo funkce receptorů. Bylo zjištěno, že abnormální glykosylace ionotropních glutamátových receptorů může mít význam v rozvoji neurologických a psychiatrických poruch jako je například schizofrenie. Tudíž porozumění molekulárním mechanismům, které se podílejí na regulaci glykosylace ionotropních glutamátových receptorů, může mít význam pro vývoj nových způsobů léčby pacientů se změněnou funkcí glutamátergních synapsí v centrální nervové soustavě.

Klíčová slova: glykosylace, glutamátový receptor, iontový kanál, NMDA, kainát, AMPA, posttranslační modifikace

Abstract

Glutamate is the most abundant excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system. There are two distinct types of glutamate receptors, ionotropic and metabotropic, present in the mammalian excitatory synapses. My thesis is focused on the ionotropic glutamate receptors, which play critical roles in learning and memory formation. The main subtypes of ionotropic glutamate receptors are α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA), *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and kainate receptors. All types of the ionotropic glutamate receptors, which are assembled as tetramers, contain many glycosylation sites, which can be modified by glycans or monosaccharides. The glycans and monosaccharides attached to the ionotropic glutamate receptors have been shown to regulate key processes such as folding of the subunits, transport to the cell surface as well as their functional properties. Recent literature also suggests that many neurological and psychiatric disorders such as schizophrenia exhibit abnormal glycosylation of ionotropic glutamate receptors. Thus, understanding of the molecular mechanisms, which regulate the glycosylation of the ionotropic glutamate receptors, may be important for developing new therapies for the patients with altered functioning of the glutamatergic synapses in the central nervous system.

Key words: glycosylation, glutamate receptor, ion channel, NMDA, kainate, AMPA, posttranslational modifications

Seznam použitých zkratk

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina
ATD	amino-terminální doména (amino-terminal domain)
BHK-570	ledvinné buňky mláďat křečků (baby hamster kidney-570)
CDG	vrozené poruchy glykosylace (congenital disorders of glycosylation)
Cgn I	galektin kongerin I (galectin congerin I)
CNS	centrální nervová soustava (central nervous system)
Con A	konkanavalin A (concanavalin A)
CTD	karboxy-terminální doména (carboxy-terminal domain)
EC ₅₀	koncentrace agonisty, při které má odpověď 50 % hodnotu maximální amplitudy
ER	endoplasmatické retikulum (endoplasmatic reticulum)
ERAD	degradace proteinů asociovaná s endoplasmatickým retikulem (endoplasmic reticulum associated degradation)
Endo H	endoglykosidáza H (endoglycosidase H)
Fuc	fukóza (fucose)
GA	Golgiho aparát (Golgi apparatus)
Gal	galaktóza (galactose)
GalNAc	<i>N</i> -acetylgalaktosamin (<i>N</i> -acetylgalactosamine)
Glc	glukóza (glucose)
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglukosamin (<i>N</i> -acetylglucosamine)
GSs	glykosidázy (glycosidases)
GTs	glykosyltransferázy (glycosyltransferases)
HEK 293	lidské embryonální ledvinné buňky (human embryonic kidney 293)
HNK-1	trisacharid HSO ₃ -3GlcA β 1-3Gal β 1-4GlcNAc (human natural killer-1)
iGluRs	ionotropní glutamátové receptory (ionotropic glutamate receptors)

LBD	doména vázající ligand (ligand binding domain)
LTP	dlouhodobá potenciace (long-term potentiation)
LTD	dlouhodobá deprese (long-term depression)
Man	manóza (mannose)
mGluRs	metabotropní glutamátové receptory (metabotropic glutamate receptors)
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-asparagová kyselina (<i>N</i> -methyl-D-aspartate)
<i>O</i> -GlcNAcylation	<i>O</i> -vázaná β - <i>N</i> -acetylglukosaminylation (<i>O</i> -linked β - <i>N</i> -acetylglucosaminylation)
OST	oligosacharid protein transferáza (oligosaccharide-protein transferase)
PNGáza F	peptid- <i>N</i> -glykosidáza F (peptide- <i>N</i> -glycosidase F)
TMD	transmembránová doména (transmembrane domain)
UDP-GlcNAc	uridin difosfát <i>N</i> -acetylglukosamin (uridine diphosphate <i>N</i> -acetylglucosamine)

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Struktura ionotropních glutamátových receptorů	3
2.1	Podjednotkové složení receptoru.....	3
2.2	Domény receptoru	4
2.2.1	Extracelulární amino-terminální doména.....	4
2.2.2	Extracelulární doména vázající ligand	5
2.2.3	Transmembránová doména	5
2.2.4	Intracelulární karboxy-terminální doména.....	5
3	Glykosylace.....	7
3.1	<i>N</i> -glykosylace	8
3.2	<i>O</i> -vázaná β - <i>N</i> -acetylglukosaminylace	10
4	Glykosylace ionotropních glutamátových receptorů	11
4.1	Glykosylace AMPA receptorů.....	13
4.2	Glykosylace kainátových receptorů.....	18
4.3	Glykosylace NMDA receptorů	19
5	Onemocnění spojená s poruchou glykosylace ionotropních glutamátových receptorů ..	22
5.1	Schizofrenie	22
5.2	Rasmussenova encefalitida	23
5.3	Encefalitida s protilátkami proti NMDA receptorům.....	23
5.4	Vrozené poruchy glykosylace.....	23
6	Závěr	25
7	Seznam použité literatury.....	27

1 Úvod

Glutamátové receptory jsou aktivovány hlavním excitačním neuropřenašečem glutamátem. Vyskytují se v centrální nervové soustavě (CNS) savců na různých typech buněk včetně neuronů a glií (Traynelis, 2010). Přítomnost a význam glutamátu v CNS začal být zkoumán v 60. letech 20. století (Curtis *et al.*, 1960). V 80. letech byly objeveny glutamátové receptory nalezené převážně na membránách postsynaptických neuronů (Watkins & Evans, 1981).

Glutamátové receptory jsou děleny na ionotropní a metabotropní receptory (Niciu *et al.*, 2012). Ionotropní glutamátové receptory (iGluRs) jsou membránové iontové kanály, které se otevřou po navázání agonisty glutamátu (Meyerson *et al.*, 2014). Metabotropní glutamátové receptory (mGluRs) jsou membránové receptory spřažené s G proteiny (Bhave *et al.*, 2003). Po navázání glutamátu na velkou extracelulární doménu receptoru dochází k přenosu signálu na intracelulární signální partnery (Niswender & Conn, 2010). Ve své práci se budu věnovat iGluRs.

iGluRs jsou rozdělovány do čtyř skupin dle agonisty na NMDA (*N*-methyl-D-aspartát), AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina), kainátové (2-karboxy-3-karboxymethyl-4-isopropenylpyrrolidin) a δ receptory. U δ receptorů dosud není objasněno, zda tvoří kanály vážící ligand nebo zda se jejich fyziologická funkce realizuje prostřednictvím proteinových interakcí (Orth *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2007).

iGluRs zprostředkovávají rychlý excitační synaptický přenos, což je vlastnost důležitá pro funkci CNS (Traynelis, 2010). Dále hrají klíčovou roli v synaptické plasticitě, schopnosti zesílení nebo zeslabení synapse v závislosti na vzrůstu nebo poklesu aktivity synaptického přenosu. Dlouhodobá synaptická plasticita je důležitá pro proces učení a paměti. Existují dvě formy dlouhodobé synaptické plasticity, LTP (dlouhodobá potenciace) a LTD (dlouhodobá deprese). LTP je dlouhodobé zesílení synaptického přenosu mezi dvěma neurony po opakované stimulaci. Naopak LTD má na míru synaptického přenosu opačný účinek než LTP, dlouhodobý synaptický přenos snižuje (Migliore *et al.*, 2015).

Abnormální regulace glutamátových receptorů se může podílet na vzniku mnoha neurologických a psychiatrických onemocnění, jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, epilepsie, deprese, schizofrenie (Bowie, 2008) a bipolární

porucha (Simpson *et al.*, 2012). Porozumění mechanismům regulace iGluRs, mezi které patří i jejich glykosylace, může přispět ke zdokonalení léčby pacientů s těmito poruchami.

Cílem této práce je popsat strukturu iGluRs a základní mechanismy *N*-glykosylace a *O*-vázané β -*N*-acetylglukosaminylace (*O*-GlcNAcylation). Jejím hlavním záměrem je shrnout poznatky o roli *N*-glykosylace a *O*-GlcNAcylation iGluRs v savčích neuronech, která je studována s využitím různých expresních systémů. V poslední části se chci zabývat onemocněními, která mají souvislost s poruchou glykosylací iGluRs.

2 Struktura ionotropních glutamátových receptorů

2.1 Podjednotkové složení receptoru

iGluRs jsou integrální proteiny procházející membránou, které se skládají do formy tetramerů (Obr. č. 1). Většina iGluRs jsou heterotetramery, složené nejméně ze dvou typů podjednotek. Avšak podjednotky AMPA a některých kainátových receptorů mohou tvořit i funkční homotetramery. Každá skupina iGluRs zahrnuje několik druhů podjednotek, ze kterých může být receptor sestaven (Traynelis, 2010).

AMPA receptory jsou složeny z podjednotek GluA1 – GluA4, které jsou schopny tvorby funkčních homotetramerů i heterotetramerů. Asi 80 % synaptických receptorů v CA1 – CA3 oblasti hipokampu a více než 90 % somatických receptorů mimo tuto oblast se skládá do GluA1/GluA2 heterotetramerů. Zbytek receptorů tvoří převážně GluA2/GluA3 heterotetramery (Lu *et al.*, 2009).

Kainátové receptory sestávají z podjednotek GluK1 – GluK5. Pouze podjednotky GluK1 – GluK3 mohou vytvořit funkční receptor ve formě homotetramerů i heterotetramerů. Podjednotky GluK4 a GluK5 tvoří funkční receptor pouze v kombinaci s GluK1 – GluK3 podjednotkou (Fisher & Fisher, 2014).

δ receptory se skládají z podjednotek GluD1 – GluD2 a tvoří pouze funkční homotetramery (Orth *et al.*, 2013).

NMDA receptory jsou tvořeny podjednotkami GluN1, GluN2A – GluN2D, GluN3A – GluN3B, které se na rozdíl od ostatních tříd iGluRs skládají pouze do heterotetramerů (Yamamoto *et al.*, 2015). Gen pro GluN1 podjednotku vykazuje vysokou variabilitu díky alternativnímu sestřihu, při kterém může vzniknout 8 různých isoform podjednotky, GluN1-1a/b – GluN1-4a/b. Jednotlivé isoformy se liší přítomností nebo absencí krátkého úseku aminokyselin kódovaných exonem 5 na amino-terminální části receptoru a odlišným užitím exonů 21 a 22 umístěných na karboxy-terminální části receptoru (Chazot & Stephenson, 1997).

Pro vytvoření funkčního NMDA receptoru je nezbytné složení dvou podjednotek GluN1 a dvou identických podjednotek GluN2 (Chazot & Stephenson, 1997) nebo kombinace dvou GluN1 s GluN2 a GluN3 podjednotkou. Další možností je složení

podjednotek do triheterotetramerních receptorů, například GluN1 v kombinaci se dvěma různými typy GluN2 podjednotek (Stroebe *et al.*, 2014).

Aktivace NMDA receptoru je doprovázena současným navázáním glycinu a glutamátu, na rozdíl od AMPA a kainátových receptorů, které vyžadují pouze vazbu glutamátu (Kleckner & Dingledine, 1988). NMDA receptory jsou také unikátní vysokou propustností Ca^{2+} iontů a napětově závislou bloádou Mg^{2+} ionty. Depolarizace postsynaptické membrány vede k odstranění Mg^{2+} iontů z póru a k aktivaci NMDA receptoru (Chazot & Stephenson, 1997; Gu *et al.*, 2015). Vazebné místo NMDA receptoru pro glutamát je na GluN2 podjednotce. Vazebné místo pro glycin se nachází na GluN1 a GluN3 podjednotkách (Cheriyana *et al.*, 2015). Některé studie také uvádí možnou vazbu D-serinu místo glycinu na GluN1 a GluN3 podjednotky (Mothet *et al.*, 2000).

2.2 Domény receptoru

Všechny podjednotky iGluRs sdílí stejnou membránovou topologii (Obr. č. 2), která zahrnuje extracelulární amino-terminální doménu (ATD), extracelulární doménu vázající ligand (LBD), transmembránovou doménu (TMD) a intracelulární karboxy-terminální doménu (CTD) (Sobolevsky, 2015). Extracelulární ATD a LBD mají dvojčetnou rotační symetrii, na rozdíl od TMD, která má čtyřčetnou rotační symetrii (Schauder *et al.*, 2013). Pro vytvoření iontového kanálu je nutné složení všech čtyř TMD, na rozdíl od ostatních domén receptoru. Nejsilnější spojení ve struktuře receptoru je mezi TMD, které přispívá k udržení stability receptoru složeného do tetrameru. Tomu nasvědčuje i studie, kde mutace v rozhraních TMD narušily správné skládání podjednotek iGluRs (Salussolia *et al.*, 2013). Další rozhraní, která zprostředkovávají silnou interakci mezi podjednotkami iGluRs jsou v ATD a LBD (Sobolevsky, 2015).

2.2.1 Extracelulární amino-terminální doména

ATD má strukturu podobnou tvaru mušle složenou ze dvou laloků R1 a R2, které jsou spojeny smyčkami. Amino-terminální část receptoru leží na vrcholu laloku R1 a spodní část R2 laloku je ATD připojena k LBD (Karakas *et al.*, 2009). Jelikož jsou iGluRs membránové proteiny, jejich aminokyselinová sekvence obsahuje krátký signální peptid, který se nachází na amino-terminální části proteinu. Signální peptid slouží k nasměrování a inzerci proteinu do membrány endoplasmatického retikula (ER) a poté je proteolyticky odštěpen (Vermeire *et al.*, 2014). ATD není důležitá pro vytvoření funkčního receptoru, ale má regulační roli.

Je známo, že ovlivňuje pravděpodobnost otevření, deaktivaci, desensitizaci a složení podjednotek iGluRs (Yuan *et al.*, 2009). ATD NMDA receptoru má ve štěrbině mezi laloky R1 a R2 vazebná místa pro dvojmocné kationty včetně Zn^{2+} iontů, pro negativní alosterické modulátory včetně ifenprodilu (Karakas *et al.*, 2009) a také disponuje vazebnými místy pro extracelulární proteiny jako je *N*-kaderin (Saglietti *et al.*, 2007). Na rozdíl od NMDA receptoru, ATD AMPA a kainátových receptorů neváží ionty a malé molekuly, přestože mají s NMDA receptory téměř stejnou strukturu domény (Kumar *et al.*, 2009). V ATD je umístěna většina glykosylačních míst iGluRs (Hollmann *et al.*, 1994).

2.2.2 Extracelulární doména vázající ligand

LBD je vysoce konzervovaná v rámci tříd iGluRs. Zaujímá strukturu podobnou mušli a je tvořena dvěma extracelulárními segmenty označovanými jako S1 a S2. S1 segment je umístěn na amino-terminální straně M1 transmembránového helixu a tvoří lalok D1. S2 segment leží mezi M3 a M4 transmembránovými helixy a tvoří druhý lalok D2. Vazebné místo pro ligand se nachází ve štěrbině mezi laloky D1 a D2 (Sobolevsky *et al.*, 2009; Mah, 2005). Prvním krokem pro aktivaci receptoru je vazba agonisty do vazebného místa v LBD. Vazebné místo LBD interaguje s α -amino a α -karboxy skupinou agonisty, což způsobí konformační změnu receptoru, která vyústí v otevření iontového kanálu (Pentikäinen *et al.*, 2003). LBD také obsahuje několik glykosylačních míst, ale mnohem méně než ATD (Hollmann *et al.*, 1994).

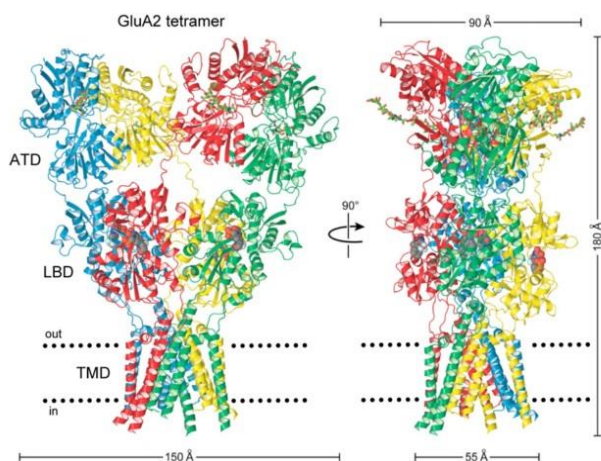
2.2.3 Transmembránová doména

TMD tvoří samotný iontový kanál receptoru. Je tvořena třemi transmembránovými helixy M1, M3, M4 a M2 segmentem, který se také podílí na tvorbě póru iontového kanálu, tvoří vlásenkovou strukturu, která se do membrány noří pouze částečně na intracelulární straně membrány (Wood *et al.*, 1995; Stern-Bach *et al.*, 1994). Propustnost AMPA receptoru pro ionty může být regulovaná posttranskripčně pomocí editace RNA v tzv. QRN místě, které se nachází na vrcholu M2 smyčky. Aminokyselina glutamin je změněna na arginin enzymem adenosin deaminázou (La Via *et al.*, 2013).

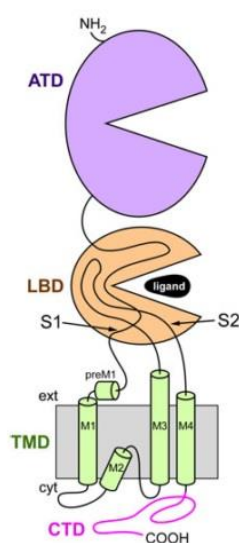
2.2.4 Intracelulární karboxy-terminální doména

V 90. letech bylo zjištěno, že CTD iGluRs je lokalizována intracelulárně (Seal *et al.*, 1995; Taverna *et al.*, 1994). Mezi jednotlivými třídami iGluRs se doména liší svou délkou a složením aminokyselinové sekvence. Jelikož CTD obsahuje mnoho fosforylačních

a vazebných míst pro intracelulární proteiny, zastává regulační funkci. Ovlivňuje zacílení receptoru a jeho udržení v membráně, zprostředkovává interakci receptoru s buněčným cytoskeletem, adaptorovými, kotevními a signalizačními proteiny (Ehlers *et al.*, 1998).



Obr. č. 1: Krystalografická struktura tetramerického AMPA receptoru složeného z GluA2 podjednotek (převzato dle Traynelis, 2010).



Obr. č. 2: Topologie podjednotek glutamátového receptoru. Na ATD tvořenou dvěma laloky navazuje LBD, která je složena ze dvou segmentů S1 a S2 a vytváří štěrbinu pro vazbu ligandu. Dále následuje M1 helix TMD, M2 smyčka, transmembránové helixy M3, M4 a na intracelulární straně membrány se nachází CTD (převzato dle Sobolevsky, 2015).

3 Glykosylace

Glykosylace je jednou ze základních posttranslačních modifikací proteinů, při níž dochází ke kovalentnímu navázání glykanu na polypeptidový řetězec v ER (Dennis *et al.*, 2009). Mezi další posttranslační modifikace se řadí například fosforylace, S-nitrosylace a ubiquitinace (Nakato *et al.*, 2015; Sreelatha *et al.*, 2015; Swatek & Komander, 2016).

Glykosylace je evolučně konzervovaný proces přítomný u prokaryotických i eukaryotických organismů (Schwarz & Aebersold, 2011). Díky své komplexitě poskytuje buňce přídavnou informační úroveň k primární struktuře proteinů danou pořadím aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Glykosylace proteinů je významná pro mnoho buněčných dějů. Jelikož se velké množství glykoproteinů nachází na buněčném povrchu, podílí se na interakci s vnějším prostředím, což zahrnuje buněčnou signalizaci, adhezi k povrchům, zánětlivou a imunitní reakci, vazbu proteinů – lektinů a dalších molekul. Glykosylace také ovlivňuje správné složení proteinů v ER a jejich průchod sekreční dráhou (Aebersold *et al.*, 2010; Cummings, 2009).

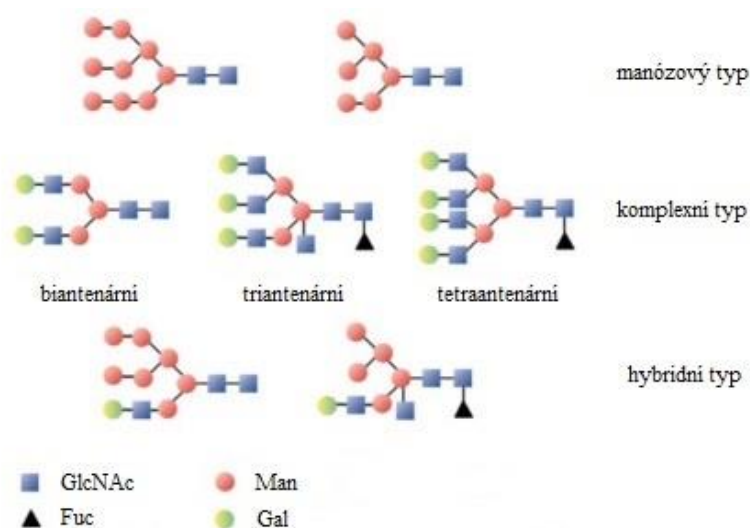
U savců se na glykosylaci podílí téměř 700 proteinů a jsou schopny vytvořit více než 7000 odlišných glykanových struktur. Základními stavebními monosacharidy, ze kterých jsou struktury tvořeny, jsou galaktóza (Gal), glukóza (Glc), fukóza (Fuc), *N*-acetylgalaktosamin (GalNAc), *N*-acetylglukosamin (GlcNAc), glukuronová kyselina, iduronová kyselina, manóza (Man), kyselina sialová a xylóza (Cummings, 2009; Moremen *et al.*, 2012).

Je rozlišováno několik základních druhů glykosylací, mezi které patří *N*-glykosylace, *O*-glykosylace, C-manosylace a *O*-GlcNAcylation. *O*-glykosylace je připevnění glykanu glykosidickou vazbou na aminokyseliny serin nebo threonin u většiny proteinů, dále na hydroxylysin u kolagenu nebo na tyrosin u glykogeninu, ale na rozdíl od *N*-glykosylace nevyžaduje připojení glykanu unikátní konsenzus sekvenci. Monosacharidy jsou k proteinu přidávány jednotlivě, čímž je také odlišná od tvorby *N*-glykanů (Yao *et al.*, 2015). C-manosylace se vyznačuje vytvořením kovalentní vazby mezi dvěma atomy uhlíku, monosacharidu manózy a první aminokyseliny tryptofanu v konsenzus sekvenci W-X-X-W (Furmanek & Hofsteenge, 2000). Ve své práci se zabývám pouze *N*-glykosylací a *O*-GlcNAcylation, vzhledem k jejich kritické roli ve funkci iGluRs.

3.1 N-glykosylace

N-glykosylace je proces připojení glykanu k atomu dusíku aminokyseliny asparaginu v polypeptidovém řetězci proteinu. Připojení glykanu na protein vyžaduje rozpoznání konsenzus sekvence N-X-S/T, kde N je aminokyselina asparagin, S je serin, T značí threonin a X může být jakákoli aminokyselina kromě prolinu. Další méně častou konsenzus sekvencí bývá N-X-C, kde jsou aminokyseliny serin nebo threonin nahrazeny cysteinem (Zielinska *et al.*, 2010).

Téměř polovina lidských proteinů je glykosylována a velkou část z nich tvoří právě N-glykoproteiny. Existují tři typy struktur N-glykanů, manóзовé, hybridní a komplexní (Obr. č. 3), které jsou tvořeny na základě odlišného zpracování základního prekursoru N-glykanů $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ v ER a Golgiho aparátu (GA). Manóзовý typ glykanů je tvořen pouhým odštěpováním jednotlivých manóz z prekursoru pomocí enzymu α -manosidázy. Komplexní struktury jsou tvořeny odštěpováním i vazbou dalších sacharidů. Hybridní typ glykanů sdílí vlastnosti jak manóзовého, tak komplexního typu glykanů (Dalpathado & Desaire, 2008).



Obr. č. 3: Struktury manóзовého, komplexního a hybridního typu N-glykanů (převzato a upraveno dle Dalpathado & Desaire, 2008).

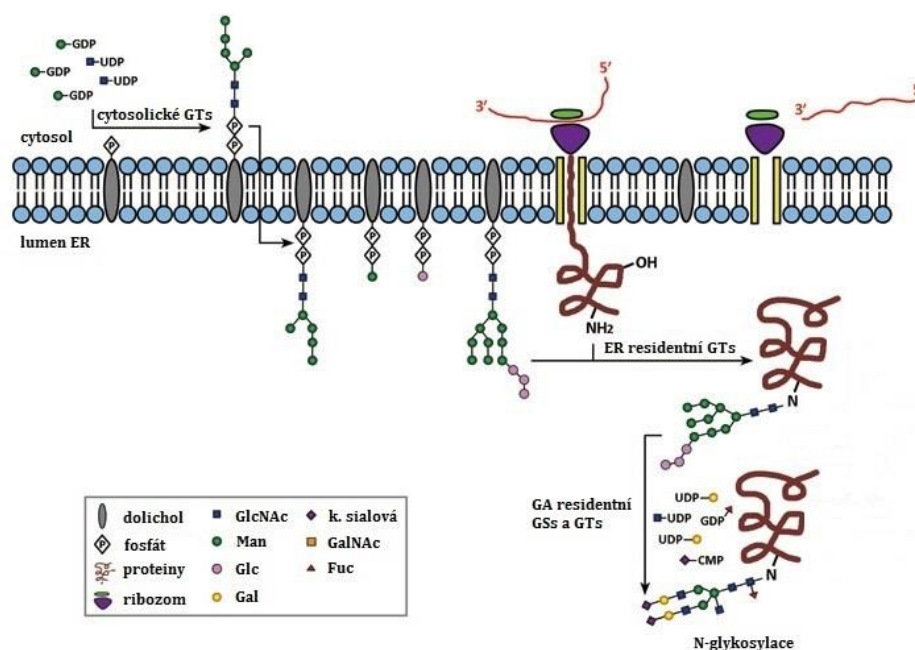
Syntéza N-glykanu začíná v cytosolu buňky navázáním aktivovaného UDP-GlcNAc fosfodiesterovou vazbou na dolichol, polyisoprenoidní lipid vázaný v membráně ER (Obr. č. 4). Poté co je pomocí enzymů glykosyltransferáz (GTs) nasyntetizována struktura $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, dochází k translokaci glykanu pórem Sec61 do lumen ER. Následně dochází

k vytvoření základního prekursoru *N*-glykanů $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, který je identický u rostlin, živočichů i jednobuněčných eukaryot. Jakmile je prekursor nasyntetizován, dojde k jeho přenosu v lumen ER z dolicholu na asparagin, který je součástí konsenzus sekvence N-X-S/T vznikajícího polypeptidu enzymem oligosacharid protein transferázou (OST) (Aebi, 2013).

Enzym OST se skládá se tří podjednotek. Riboforiny I a II jsou integrální membránové proteiny ER, jejichž cytosolické domény se váží s velkou podjednotkou ribozomu. Třetí podjednotka uvnitř ER zprostředkovává vlastní přenos glykanu (Silberstein & Gilmore, 1996).

Po přesunu glykanu na polypeptidový řetězec dojde k odstranění dvou glukóz z glykanu a vzniká $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Tato struktura se stává ligandem pro chaperony kalnexin a kalretikulin, které zajišťují správné složení a kontrolují kvalitu nově syntetizovaného glykoproteinu (Molinari *et al.*, 2004). Nesprávně sbalené proteiny jsou rozeznávány ER α -manosidázou I a translokovány do cytosolu. Poté jsou enzymem peptid-*N*-glykosidázou F (PNGázou F) odstraněny *N*-glykany a protein je degradován v proteasomu. Tento proces je označován jako degradace proteinů asociovaná s ER (ERAD) (Briant *et al.*, 2015). Disociace správně sbaleného proteinu od chaperonů je doprovázena enzymatickým odštěpením glukózy a poté je protein transportován do GA (Hiraizumi *et al.*, 1993).

V GA dochází k většině modifikací *N*-glykanů. Enzymy glykosidázy (GSs) a GTs, které se podílejí na modifikaci *N*-glykanů, jsou lokalizovány ve směru od cis-Golgi k trans-Golgi (Stanley, 2011). Cis-GA obsahuje manosidázy, které mají roli ve štěpení manóz a tvorbě manózových glykanů. V mediální části GA je zahájena tvorba komplexních *N*-glykanů, jejich větvením a fukosylací proximálního GlcNAc (Moremen *et al.*, 2012). V této části GA začíná být *N*-glykoprotein rezistentní na působení Endo H. To je velmi často využíváno při studiu sekreční dráhy glykoproteinů (Mah, 2005). V trans-GA se glykany dále větví a dochází k jejich galaktosylaci, sialylaci, sulfataci a k terminální fukosylaci komplexních typů glykanů (Stanley, 2011). Poté jsou glykoproteiny ve váčcích sekretovány do extracelulárního prostředí nebo začleněny do buněčné membrány (Mah, 2005). V celém procesu je velmi důležitý retrográdní transport, který zajišťuje návrat rezidentních proteinů ER a GA (Ong *et al.*, 2014).



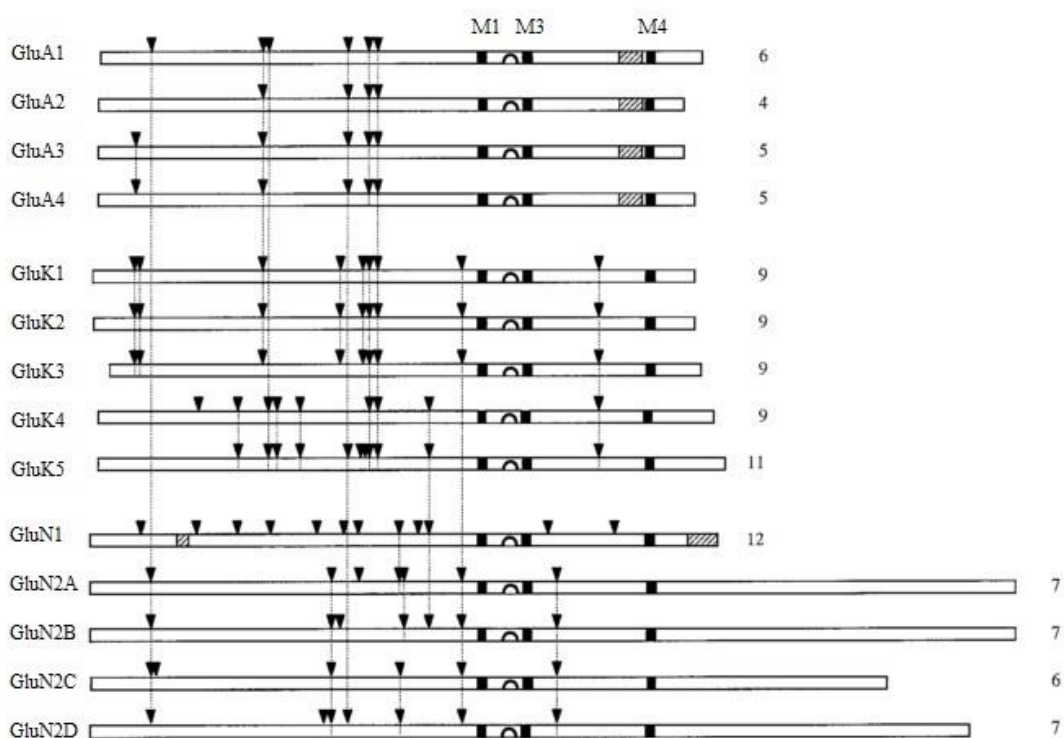
Obr. č. 4: Syntéza a zpracování *N*-glykanů v ER a GA. Syntéza základního prekursoru *N*-glykanů $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ začíná na cytosolické straně ER a je dokončena po translokaci vznikajícího glykanu do lumen ER. Poté je prekursor pomocí glykosyltransferázy OST přesunut na aminokyselinu asparagin v glykosylační konsenzus sekvenci vznikajícího proteinu. Následně jsou glykoproteiny v GA větveny a modifikovány pomocí enzymů GTs a GSs a vznikají strukturně vysoce variabilní *N*-glykany (převzato a upraveno dle Wang *et al.*, 2014).

3.2 *O*-vázaná β -*N*-acetylglukosaminylace

O-GlcNAcylation je připevnění monosacharidu GlcNAc glykosidickou vazbou na aminokyselinu serin nebo threonin pomocí enzymu *O*-GlcNAc transferázy (Pathak *et al.*, 2015). Byla objevena začátkem 80. let 20. století a díky modifikaci stejných aminokyselin kompetuje s fosforylací. Na rozdíl od extracelulárních glykosylací se *O*-vázané GlcNAc nejvíce nalézají na cytoplasmatických a jaderných proteinech, ale také v intracelulárních kompartmentech včetně mitochondrií. Při *O*-GlcNAcylationi nedochází k prodlužování glykanu a nevznikají komplexní struktury. GlcNAc může být z nativního proteinu odstraněn a znovu přidáván, jako je to běžné u fosforylace. *O*-GlcNAcylation se podílí na regulaci buněčné signalizace a transkripce v reakci na vystavení stresovým podmínkám a nutrientům (Kim, 2011; Yao *et al.*, 2015).

4 Glykosylace ionotropních glutamátových receptorů

V 90. letech prvotní studie ukázaly, že iGluRs jsou modifikovány *N*-glykosylací (Taverna *et al.*, 1994; Everts *et al.*, 1997; Blackstone *et al.*, 1992). Podjednotky iGluRs obsahují 4 – 12 potenciálních extracelulárních míst pro *N*-glykosylaci, které jsou založeny na univerzální konsenzus sekvenci N-X-S/T, $X \neq P$ (Obr. č. 5). Mnoho z těchto míst je evolučně konzervováno nejen v rámci podjednotek stejné třídy, ale i mezi odlišnými třídami receptorů. Avšak žádné z homologních míst se nevyskytuje ve všech podjednotkách iGluRs (Everts *et al.*, 1997). Konsenzus sekvence pro vazbu *N*-glykanů se nachází na ATD a S2 segmentu LBD (Hollmann *et al.*, 1994). Znalost *N*-glykosylačních míst se často vyžívala pro určení extracelulární nebo intracelulární lokalizace jednotlivých částí receptoru (Wood *et al.*, 1995).



Obr. č. 5: Struktura podjednotek iGluRs. Šipky označují pozice extracelulárních *N*-glykosylačních konsenzus sekvencí N-X-S/T, $X \neq P$. Celkový počet *N*-glykosylačních míst podjednotek je uveden vpravo. Vertikální linie spojují evolučně konzervovaná místa na homologních pozicích mezi jednotlivými podjednotkami. Černé čtverce zobrazují TMD M1, M3 a M4. Smyčka M2, která se také podílí na tvorbě iontového kanálu je zobrazena mezi doménami M1 a M3. Šrafované obdélníky znázorňují domény, které podléhají alternativnímu sestřihu (převzato a upraveno dle Everts *et al.*, 1997).

N-glykosylace reguluje správné složení, stabilitu receptoru a jeho transport z GA na povrch buňky (Vagin *et al.*, 2009). Také se podílí na ochraně receptoru před proteázami, má vliv na formování LBD a usnadňuje rozpoznávání receptoru extracelulárními modulátory. Role *N*-glykosylace je odlišná u různých receptorů a také se liší podle konkrétního *N*-glykosylačního místa (Lis & Sharon, 1993). Například první výzkum, který popisuje důležitost *N*-glykosylace pro vazbu ligandu (glycinu) do vazebného místa receptoru, byl prováděn na GluN1 podjednotce myšího NMDA receptoru exprimovaného ve hmyzích buňkách s užitím bakulovirového expresního systému (Kawamoto *et al.*, 1995).

N-glykany se od sebe navzájem liší, ale typ glykanu na konkrétním místě konkrétního receptoru zůstává ve většině případů stále stejný (Jenkins *et al.*, 1996). Rozdíly mohou nastat změnou podmínek kultivace, druhovou odlišností, volbou jiného buněčného nebo tkáňového typu (Hsieh *et al.*, 1983).

Role *N*-glykosylace iGluRs je studována hlavně sledováním vlivu působení deglykosylačních enzymů na vlastnosti nativních a rekombinantních receptorů nebo vytvářením bodových mutací v konsenzus *N*-glykosylačních sekvencích receptoru (Standley & Baudry, 2000). Mutace aminokyseliny v *N*-glykosylačním místě zabrání vazbě glykanu na receptor (Taverna *et al.*, 1994). Při studiu *N*-glykanů jsou nejčastěji využívány inhibitory a enzymy jako jsou tunikamycin, endoglykosidáza H (Endo H) a PNGáza F.

Tunikamycin je hydrofobní analog UDP-GlcNAc, který zabrání přidání GlcNAc na dolichol a tím specificky inhibuje *N*-glykosylaci (Everts *et al.*, 1997). Jelikož tunikamycin inhibuje *N*-glykosylaci všech typů proteinů v ER, není vhodný pro studium individuálních rolí *N*-glykosylačních míst (Pasternack *et al.*, 2003). Bylo zjištěno, že tunikamycin rovněž snižuje aktivitu AMPA a NMDA receptorů mechanismem nezávislým na *N*-glykosylaci, jelikož inhibuje synaptický přenos i LTP v *gyrus dentatus* a v potkaním hipokampu modifikuje afinitu receptoru pro agonisty (Maruo *et al.*, 2003; Maruo *et al.*, 2006).

Endo H je rekombinantní glykosidáza, která štěpí vazbu mezi dvěma proximálními GlcNAc v manózových a některých hybridních typech *N*-glykanů vázaných na proteinech lokalizovaných v ER a cis-Golgi. V mediální části GA se glykoprotein stává rezistentní proti působení Endo H (Mah, 2005).

PNGáza F je amidáza, která štěpí všechny glykany navázané na asparagin a tudíž je používána pro úplnou deglykosylaci *N*-glykoproteinů (Mah, 2005).

Výzkumu *O*-GlcNAcylation iGluRs nebylo věnováno tolik pozornosti jako jejich *N*-glykosylaci. Potencionální role *O*-vázaných GlcNAc v modulaci iGluRs byla usuzována na základě jejich fosforylace, která modifikuje stejné aminokyseliny a pomocí různých proteinů v synapsi, na které jsou GlcNAc navázány (Taylor *et al.*, 2014). Jedním z enzymů, který je využívám pro výzkum *O*-GlcNAcylation je alloxan. Jedná se o toxin strukturně podobný uracilu, který poškozuje beta buňky slinivky. Alloxan je inhibitor enzymu *O*-GlcNAc transferázy, která se účastní přenosu monosacharidu GlcNAc na hydroxylovou skupinu aminokyselin serinu a threoninu. Slouží tedy jako prostředek zkoumání významu *O*-GlcNAcylation proteinů (Konrad *et al.*, 2002).

4.1 Glykosylace AMPA receptorů

Všechny podjednotky AMPA receptorů GluA1 – GluA4 jsou *N*-glykosylovány (Blackstone *et al.*, 1992). Snížení *N*-glykosylace AMPA receptorů exprimovaných v oocytech *Xenopus laevis* v přítomnosti tunikamycinu, nezabránil jejich syntéze, složení, transportu nebo inserci do buněčné membrány, ani neovlivňuje jejich funkci (Everts *et al.*, 1997). Z dalších pokusů s použitím stejného expresního systému *X. laevis* vyplývá, že všech šest potenciálních glykosylačních míst GluA1 podjednotky obsahuje navázané *N*-glykany a odstranění kteréhokoli z nich pomocí mutací v konsenzus glykosylační sekvenci, rovněž nezabránil tvorbě funkčního receptoru. Avšak mutace většiny *N*-glykosylačních konsenzus sekvencí v homotetramerních AMPA receptorech tvořených GluA1 podjednotkou, způsobují výrazný pokles funkční aktivity receptoru (Hollmann *et al.*, 1994).

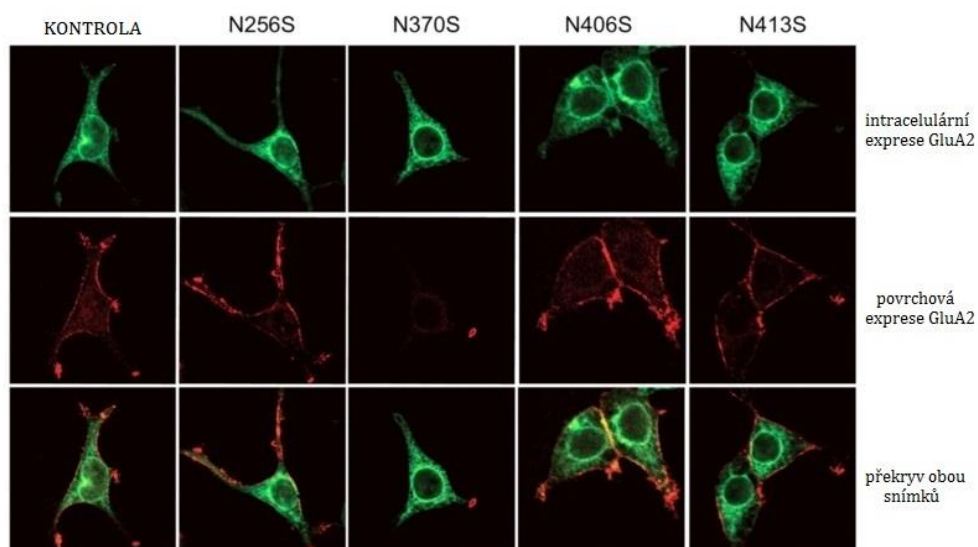
Bylo zjištěno, že dvě evolučně konzervovaná místa na pozicích N407 a N414 v LBD GluA4 podjednotky homotetramerního AMPA receptoru jsou *N*-glykosylovány. S využitím expresního systému lidských embryonálních buněk (HEK 293) bylo ukázáno, že *N*-glykany vázané na těchto místech nehrají významnou roli ve zprostředkování interakce receptoru a ligandu, nemají vliv na desensitizaci odpovědi na glutamát a AMPA, ani nejsou kritické pro tvorbu a povrchovou lokalizaci receptoru. Ze studie dále vyplývá, že *N*-glykany na pozicích N407 a N414 nejsou klíčové pro formování funkčního receptoru, ale současné odstranění více *N*-glykanů může mít dopad na jeho funkční vlastnosti (Pasternack *et al.*, 2003).

Kompletní *N*-glykosylace podjednotek AMPA receptorů v transfekovaných ledvinných buňkách mláďat křeček (BHK-570) je kritická pro jejich povrchovou expresi. V plasmatické membráně bylo nalezeno pouze 10 % receptorů s neúplně glykosylovanými

podjednotkami. To naznačuje, že minimálně jeden z *N*-glykanů je zodpovědný za inzerci receptoru do plasmatické membrány. Ze studie také vyplývá, že pro složení receptoru z jednotlivých podjednotek není jejich *N*-glykosylace nezbytná (Hall *et al.*, 1997). Předpokládá se, že *N*-glykosylace podjednotek AMPA receptorů je rovněž nutná pro jejich lokalizaci v excitačních synapsích v neuronech (Standley & Baudry, 2000).

HNK-1 je trisacharid se sulfonovou skupinou ($\text{HSO}_3\text{-3GlcA}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-4GlcNAc}$), který je součástí adhezivních molekul v nervovém systému. Je nalézán také v *N*-glykanech GluA2 podjednotky AMPA receptoru a reguluje jeho povrchovou expresi. Bylo zjištěno, že HNK-1 exprimovaný v HEK 293 buňkách, který je navázán na *N*-glykan na pozici N413, podporuje interakci GluA2 podjednotky s *N*-kadherinem, což má za následek její zvýšenou expresi na buněčném povrchu. Ostatní *N*-glykany nesoucí HNK-1 mají velmi malý vliv na interakci GluA2 podjednotky s *N*-kadherinem (Takeuchi *et al.*, 2015).

Dále byly zkoumány čtyři potenciální *N*-glykosylační místa GluA2 podjednotky AMPA receptoru exprimovaných v HEK 293 buňkách na pozicích N256, N370, N406 a N413. Zjistilo se, že absence *N*-glykanu na pozici N370 snižuje povrchovou expresi GluA2 podjednotky (Obr. č. 6). Mutace ostatních konsenzus *N*-glykosylačních míst povrchovou expresi GluA2 podjednotek neovlivňovala. Povrchová exprese GluA1 podjednotky exprimované společně s mutantní GluA2 N370S podjednotkou byla také snížena (Takeuchi *et al.*, 2015), neboť GluA1/GluA2 heterotetramery tvoří většinu AMPA receptorů v nervovém systému (Lu *et al.*, 2009).



Obr. č. 6: Imunologické značení kontrolních a mutantních GluA2 podjednotek AMPA receptoru exprimovaných v HEK 293 buňkách. GluA2 podjednotka na buněčném povrchu byla imunologicky značena anti-GluA2 amino-terminální monoklonální protilátkou (červená). GluA2 podjednotka lokalizovaná intracelulárně byla následně značena anti-GluA2/GluA3 polyklonální protilátkou po permeabilizaci buňky (zelená). Z pokusu vyplývá, že *N*-glykan na pozici N370 je kritický pro povrchovou expresi GluA2 podjednotky (převzato a upraveno dle Takeuchi *et al.*, 2015).

V přítomnosti nadměrného množství proteinu stargazinu, který je považován za auxiliární podjednotku AMPA receptorů a účastní se jejich transportu na buněčný povrch, bylo pozorováno velké množství nekompletně *N*-glykosylovaných AMPA receptorů složených z GluA4 podjednotek. Z toho vyplývá, že asociací se stargazinem může být ovlivněna glykosylace nebo dochází k potlačení kontrolních mechanismů, které působí v ER a GA při zpracování *N*-glykoproteinů (Coleman *et al.*, 2006).

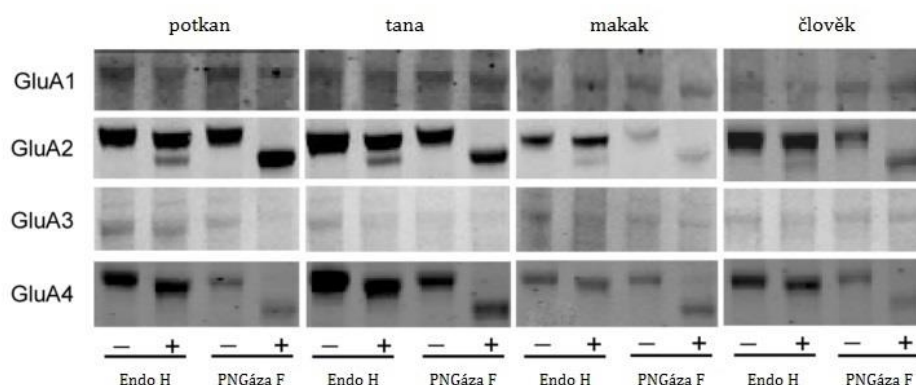
Elektrofyzilogické studie ukázaly, že *N*-glykosylace reguluje desensitizaci iGluRs, ale nemění hodnotu EC₅₀ pro agonisty AMPA receptorů. Z toho lze usoudit, že glykany nejsou součástí štěrbinu vázající ligand a nehrají významnou roli v jejím utváření (Everts *et al.*, 1997). Tento závěr byl potvrzen i v další studii, ze které vyplývalo, že *N*-glykosylace neovlivňuje vazebnou afinitu GluA2 podjednotek (Zhao *et al.*, 2012).

Fukosylace proximálního GlcNAc je u savců katalyzována enzymem α -1,6-fukosyltransferázou. Inaktivace genu pro tento enzym se u myši projeví genotypem

podobným schizofrenii a poklesem pracovní paměti, která úzce souvisí s časnou LTP. Úroveň exprese AMPA receptorů byla zvýšena v postsynaptické denzitě, ačkoli se úroveň totální exprese receptorů nezměnila. To naznačuje, že AMPA receptory bez fukosylace proximálního GlcNAc mohou existovat v aktivovaném stavu. Dále byla pozorována větší míra heterotetramerizace receptorů, což zvýšilo citlivost neuronu pro postsynaptickou depolarizaci, vyvolávalo aktivaci NMDA receptorů, zvýšený vtok Ca^{2+} iontů a aktivaci kalcium/kalmodulin-dependentní proteinkinázy II. Následkem toho docházelo k oslabení LTP (Gu *et al.*, 2015).

S využitím lektinů, proteinů vázajících glykany, bylo zjištěno, že mezi nejčastěji zastoupené monosacharidy v glykanech AMPA receptorů patří Glc, Man, GlcNAc a α -1,6-Fuc (Tucholski *et al.*, 2014). Na heterotetramerním GluA2/GluA3 a homotetramerním GluA2 AMPA receptoru v předním mozku potkana se nacházejí glykany komplexního a manóзовého typu (Standley *et al.*, 1998).

Glykosylace proteinů může přispívat k evoluci komplexity savčího mozku adaptací excitačního synaptického přenosu na environmentální a sociální podněty. Byly zkoumány druhově specifické odlišnosti *N*-glykosylace podjednotek AMPA receptorů v prefrontálním kortexu potkanů, tan, makaků a lidí (Obr. č. 7). GluA2 a GluA4 podjednotky se ukázaly jako citlivé na působení enzymů Endo H i PNGázu F, což vypovídá o převaze manóзовého a hybridního typu glykanů. Naproti tomu GluA1 a GluA3 podjednotky nebyly senzitivní k enzymatické deglykosylaci enzymem Endo H, tudíž je pravděpodobně velká část glykanů těchto podjednotek komplexního typu. U lidí a makaků je na GluA2 podjednotce navázáno větší množství manóзовých a hybridních glykanů, než u tan a potkanů. U GluA4 podjednotek se manóзовé a hybridní cukry vyskytují častěji u potkanů, tan a makaků, avšak u lidí bylo jejich množství sníženo. Studie dále potvrzuje, že všechny čtyři podjednotky AMPA receptorů jsou *N*-glykosylovány, ale také ukazuje, že existují rozdíly v glykosylaci mezi různými podjednotkami a že je patrný rozdíl v glykosylaci homologních podjednotek odlišných druhů živočichů (Tucholski *et al.*, 2014).



Obr. č. 7: Enzymatická deglykosylace podjednotek AMPA receptorů různých živočišných druhů za využití enzymů Endo H a PNGázy F. Po provedení elektroforézy je patrné, že GluA2 a GluA4 podjednotky jsou citlivé na působení enzymů, což se projevilo změnou v pohyblivosti podjednotek v polyakrylamidovém gelu. Je tedy pravděpodobné, že u GluA2 a GluA4 podjednotek převažují *N*-glykany manóзовého a hybridního typu. U GluA1 a GluA3 podjednotek žádný posun pozorován nebyl, což vypovídá o přítomnosti komplexního typu *N*-glykanů (převzato a upraveno dle Tucholski *et al.*, 2014).

Galektiny jsou skupinou lektinových proteinů, které mají afinitu ke glykanům obsahujícím β -Gal a alostericky modulují AMPA receptory. Množství a složení *N*-glykanů je na integrálních proteinech dynamicky modifikováno. Z tohoto důvodu mohou galektiny, které mění excitační synaptický přenos a neuronální excitabilitu jejich působením na AMPA i kainátové receptory, změnit v CNS fyziologické podmínky na patologické. Galektin kongerin I (Cgn I) a lidský galektin I alostericky modulují kinetiku otevírání rekombinantních AMPA receptorů (Copits *et al.*, 2014). Galektin mořské houby *Cinachyrella* má silný efekt na desensitizaci a zpomaluje otevírání AMPA receptorů (Ueda *et al.*, 2013). Na rozdíl od dalších podjednotek AMPA receptorů není GluA2 podjednotka ovlivněna lektinem konkanavalinem A (Con A), který se přednostně váže na Man a Gal glykanů (Everts *et al.*, 1997).

Nejdříve byla *O*-GlcNAcylation AMPA receptorů zkoumána v expresním systému *X. laevis*. Pro výzkum role *O*-vázaného GlcNAc v transportu AMPA receptorů byl použit enzym alloxan. Inhibice *O*-GlcNAcylation způsobila potence odpovědi AMPA receptoru, složeného z GluA1 podjednotek. Avšak bodová mutace S831A GluA1 podjednotky ve fosforylačním místě, kde působí enzym kalcium/kalmodulin-dependentní proteinkináza II způsobila, že alloxan neměl žádný potenciační účinek na receptor. Z toho vyplývá,

že alloxan může potencovat odpovědi AMPA receptoru zablokováním *O*-GlcNAcylace na fosforylačním místě (Kanno *et al.*, 2010).

Inhibice *O*-GlcNAcylace zvýšila bazální synaptický přenos na 120 % původní hodnoty a zesílila LTP v CA3 – CA1 oblasti potkaního hipokampu, přičemž nejvýrazněji její pozdní fázi. Také se zvýšil transport GluA1 a GluA2 podjednotek AMPA receptoru směrem k buněčnému povrchu (Kanno *et al.*, 2010).

V další studii byla objevena nová forma LTD v synapsích CA3 – CA1 oblasti potkaního hipokampu indukovaná nadměrným vzrůstem *O*-GlcNAcyací GluA2 podjednotky AMPA receptoru. Tato forma LTD není závislá na NMDA receptorech a proteinkináze C. Bylo zjištěno, že GluA1 podjednotka AMPA receptoru nepodléhá *O*-GlcNAcyaci, na rozdíl od předchozí studie, kde byla zjištěna přítomnost *O*-vázaného GlcNAc na pozici S831. Důvodem může být užití dvou odlišných expresních systémů. *O*-GlcNAc jsou vázány pouze na GluA2 podjednotku. Ze studie tedy vyplývá, že rychlé změny v *O*-GlcNAcyaci synaptických proteinů jsou novým mechanismem schopným modulovat synaptickou činnost (Taylor *et al.*, 2014).

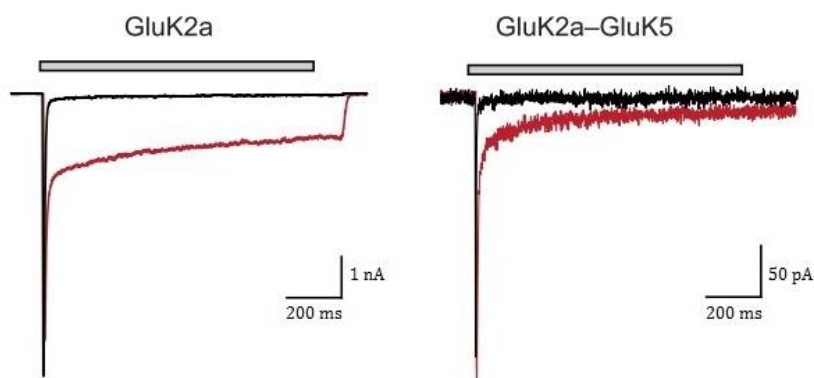
4.2 Glykosylace kainátových receptorů

GluK2 patří mezi nejstudovanější podjednotky kainátových receptorů. Byla studována čtyři *N*-glykosylační místa na pozicích N423, N430, N546 a N751 v LBD potkaního receptoru exprimovaného ve hmyzích buňkách. Přítomnost *N*-glykanů byla prokázána pouze na pozicích N423 a N751 (Nanao *et al.*, 2005). V další studii, s využitím expresního systému HEK 293 buněk, byla zjištěna přítomnost *N*-glykanů na pozicích N515 a N720, zatímco asparagin na pozici N574 nebyl glykosylován. Bodovou mutací asparaginů N515Q a T517A byla výrazně snížena velikost odpovědi receptoru po aplikaci agonisty kainátu. Příčina může spočívat ve změně afinity receptoru ke kainátu nebo ovlivněním transportu receptorů na povrch buňky. Další bodové mutace N574Q, N720Q, T722A neměly vliv na velikost odpovědi receptoru (Taverna *et al.*, 1994).

GluK2 podjednotka kainátového receptoru v expresním systému oocytů z *X. laevis* má velmi rychlou desensitizaci proudové odpovědi. Lektin Con A, který se váže na *N*-glykany GluK2 podjednotky, inhibuje desensitizaci receptoru. Dokonce i uměle zavedené *N*-glykosylační místo je dostačující pro vazbu Con A na GluK2 podjednotku (Everts *et al.*, 1999). *N*-glykosylace kainátových receptorů způsobí vzrůst rovnovážného

proudu v přítomnosti agonisty kainátu. Také je významná pro ustanovení maximální úrovně desensitizace kainátových i AMPA receptorů. Receptor v desensitizovaném stavu byl méně ovlivněn působením lektinu, z čehož vyplývá, že jeho citlivost na působení Con A je závislá na stavu aktivace receptoru. Odstranění *N*-glykanů nenarušilo tvorbu funkčního receptoru a nebyla změněna hodnota EC_{50} pro agonisty kainátových receptorů (Everts *et al.*, 1997; Everts *et al.*, 1999).

Funkce kainátových receptorů je také ovlivněna působením lektinů. Con A je neúčinnější alosterický modulátor GluK2 podjednotky kainátových receptorů (Thalhammer *et al.*, 2002). Galektin Cgn I zpomaloval nástup desensitizace u homotetramerních GluK2a a heterotetramerních GluK2a/GluK5 kainátových receptorů exprimovaných v HEK 293 buňkách (Obr. č. 8). Ze studie vyplývá, že galektiny jsou účinnými modulatory kainátových receptorů, které působí vazbou na *N*-glykany (Copits *et al.*, 2014).



Obr. č. 8: Galektin Cgn I mění nástup desensitizace kainátového receptoru. Pomocí metody terčíkového zámku, která měří proudy vyvolané aktivací iontových kanálů, byly měřeny odpovědi u homotetramerních GluK2a a heterotetramerních GluK2a/GluK5 receptorů bez (černá křivka) a v přítomnosti (červená křivka) galektinu Cgn I v HEK 293 buňkách. Je patrné, že Cgn I zpomaluje nástup desensitizace receptoru (převzato a upraveno dle Copits *et al.*, 2014).

4.3 Glykosylace NMDA receptorů

GluN podjednotky NMDA receptoru obsahují velký počet *N*-glykosylačních míst. Nejvíce, 12 míst, je přítomno na GluN1 podjednotce, která je obligatorní podjednotkou NMDA receptorů (Brose *et al.*, 1993). *N*-glykany jsou důležité pro expresi funkčního receptoru a správné formování GluN1/GluN2A heterotetrameru NMDA receptoru exprimovaného

v HEK 293 buňkách (Chazot *et al.*, 1995). Inhibice *N*-glykosylace GluN1 a GluN2A podjednotky v HEK 293 buňkách, způsobila inhibici vazby antagonisty dizocilpinu, a to ovlivněním disociační konstanty, přestože počet vazebných míst zůstal stejný. To potvrzuje předchozí studii, že *N*-glykosylace může být důležitá pro správné formování GluN1/GluN2A receptoru (Llansola *et al.*, 2005).

Inhibice *N*-glykosylace podjednotek NMDA receptoru v potkaních kortikálních neuronech i v expresním systému *X. laevis* tunikamycinem snižuje funkci povrchových receptorů. Dochází k poškození syntézy GluN1 podjednotky, zatímco tvorba GluN2A podjednotky není výrazně ovlivněna. Inhibice *N*-glykosylace aktivuje specifickou stresovou odpověď v neuronech, dráhu ERAD, jejímž výsledkem je odstranění neglykosylované GluN1 podjednotky v proteasomu. Snížení syntézy GluN1 podjednotky následně negativně ovlivní složení heterotetramerního NMDA receptoru a jeho následnou expresi (Gascón *et al.*, 2007; Everts *et al.*, 1997).

Byla zkoumána role konsenzus *N*-glykosylačních míst v GluN1, GluN2A a GluN2B podjednotkách NMDA receptoru s využitím expresních systémů opičích ledvinných fibroblastů, HEK 293 buněk, hipokampálních neuronů a granulárních mozečkových neuronů. Pomocí biochemických, mikroskopických a elektrofyziologických metod bylo zjištěno, že NMDA receptory jsou uvolněny z ER pouze tehdy, když jsou v GluN1 podjednotce receptoru *N*-glykosylovány asparaginy na pozicích N203 a N368. GluN2A a GluN2B podjednotky jsou taktéž *N*-glykosylovány, ale *N*-glykany nejsou kritické pro dopravu NMDA receptoru na povrch buněk. Výsledek studie potvrzuje, že v ER jsou přítomny kontrolní mechanismy, které sledují strukturu a přítomnost *N*-glykanů na GluN1 podjednotce NMDA receptoru. Bioinformatická analýza dále potvrdila, že glykosylační místa na pozicích N203 a N368 GluN1 podjednotky jsou evolučně konzervovaná, což poukazuje na jejich důležitost (Lichnerova *et al.*, 2015).

Také bylo zjištěno, že bodové mutace klíčových *N*-glykosylačních míst na pozicích N203 a N368 nezmění funkční vlastnosti receptorů. Odstranění *N*-glykanů z nativních NMDA receptorů pomocí enzymů PNGázy F a tunikamycinu změní afinitu receptoru pro agonistu NMDA, avšak pravděpodobnost otevření receptoru a desensitizace se odstraněním *N*-glykanů nezmění (Lichnerova *et al.*, 2015).

Inkorporace NMDA receptoru do synapse je regulována GluN2 podjednotkou různými způsoby. Receptory s GluN2B podjednotkou jsou konstitutivně inkorporovány do synapse, zatímco inkorporace GluN2A podjednotek je závislá na aktivitě a vyžaduje vazbu glutamátu na NMDA receptor. V GluN2B podjednotce NMDA receptoru v potkaním hipokampu se nachází na pozici N675 *N*-glykosylační místo, které není přítomné v podjednotce GluN2A. *N*-glykosylace tohoto asparaginu je nezbytná pro dopravu NMDA receptoru s GluN2B podjednotkou do synapse způsobem nezávislým na synaptické aktivitě. Při absenci tohoto *N*-glykosylačního místa je pro inkorporaci receptoru do synapse nutná synaptická aktivita (Storey *et al.*, 2011).

N-glykany vázané na podjednotkách NMDA receptoru, zejména na GluN1 podjednotce jsou manózového typu, což bylo dokázáno inkubací s enzymem Endo H. GluN2A podjednotky nebyly tolik citlivé na působení enzymu, tudíž je pravděpodobně většina glykanů komplexního a hybridního typu (Clark *et al.*, 1998; Huh & Wenthold, 1999). Inkubací NMDA receptorů exprimovaných v oocytech z *X. laevis* s lektinem Con A, byl zjištěn jeho mírný inhibiční účinek na desensitizaci receptoru (Everts *et al.*, 1997).

5 Onemocnění spojená s poruchou glykosylace ionotropních glutamátových receptorů

Glykosylace je důležitým regulačním mechanismem ve formování, transportu a funkci iGluRs. Absence nebo změna struktury glykanu navázaného na receptor může mít dopad na změnu kvality synaptického přenosu prostřednictvím glutamátu. Nepřirozená regulace glutamátového přenosu může přispívat nebo být důvodem vzniku závažných onemocnění, mezi která se řadí poruchy vývoje nervové soustavy, jako je syndrom fragilního X chromosomu a schizofrenie, neurodegenerativní onemocnění, mezi které patří Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba a amyotrofická laterální skleróza. Dalšími onemocněními jsou například epilepsie, deprese, úzkost a bipolární porucha (Lau & Zukin, 2007; Bowie, 2008; Simpson *et al.*, 2012). Zde uvádím několik onemocnění, u kterých byla zjištěna abnormální glykosylace iGluRs.

5.1 Schizofrenie

Schizofrenie je jednou z nejzávažnějších psychiatrických poruch, která postihuje 1 % celosvětové populace. Symptomy nemoci se rozdělují na pozitivní (halucinace, falešné představy) a negativní (ztráta normálního sociálního chování, snížení komunikace a očního kontaktu). Mnoho let byl abnormální dopaminergní nervový přenos považován za klíčový ve vzniku nemoci (Rubio *et al.*, 2012).

Nedávno byly zaznamenány poruchy i v glutamátergním přenosu, způsobené abnormální expresí iGluRs a proteinů, které regulují jejich transport. Příčinou může být poškozené zpracování nebo transport iGluRs z ER na buněčný povrch. Je možné, že změna *N*-glykanů u iGluRs a ostatních molekul asociovaných v glutamátergním přenosu přispívá k patofyziologii schizofrenie (Tucholski, Simmons, Pinner, McMillan, *et al.*, 2013).

Bylo zkoumáno, zda je rozsah *N*-glykosylace u GluN1, GluN2A, GluN2B podjednotek NMDA receptorů, či u GluK2 a GluK5 podjednotek kainátových receptorů v dorsolaterálním prefrontálním kortexu podobný u pacientů se schizofrenií v porovnání s kontrolní skupinou. Změnu v distribuci glykanů u schizofrenních pacientů vykazovala pouze GluK2 podjednotka. Glykany GluK2 podjednotky obsahovaly větší množství *N*-vázaných manózových anebo hybridních glykanů. Výsledky lze interpretovat vysvětlením, že větší množství GluK2 podjednotek může být zadrženo v ER nebo GA, což limituje její množství pro složení funkčního receptoru. Jelikož je GluK2 hlavní podjednotkou

kainátových receptorů, její zadržení má velké funkční dopady v nervovém přenosu (Tucholski, Simmons, Pinner, McMillan, *et al.*, 2013).

Také byla studována distribuce *N*-glykanů u všech čtyř podjednotek AMPA receptorů u pacientů se schizofrenií. Pouze velmi malá část GluA2 podjednotek AMPA receptorů obsahovala manózový typ glykanů, který může indikovat urychlené opuštění ER nebo zvýšený transport receptorů obsahující GluA2 podjednotku. GluA2 podjednotka byla méně senzitivní na lektin Con A. Ze všech čtyř podjednotek AMPA receptorů měla pouze GluA4 podjednotka zvýšenou expresi, zatímco exprese ostatních podjednotek AMPA receptoru nebyla změněna (Tucholski, Simmons, Pinner, Haroutunian, *et al.*, 2013).

5.2 Rasmussenova encefalitida

Rasmussenova encefalitida je vzácná neurologická zánětlivá porucha vyskytující se u dětí. Vyznačuje se těžkými záchvaty a postupující atrofií jedné z mozkových hemisfér (Owens *et al.*, 2016). Je způsobena reakcí imunitního systému na extracelulární antigen GluA3B odvozený z GluA3 podjednotky AMPA receptoru. Specifické štěpení GluA3 podjednotky serinovou proteázou granzymem B může generovat GluA3B autoantigenní peptid pouze v případě, pokud není *N*-glykosylováno místo uvnitř GluA3-granzym B rozpoznávací sekvence (ISND*S). I když je toto místo správně glykosylováno, může být glykan v průběhu života odstraněn, což může přispět k rozvoji autoimunitní choroby (Gahring *et al.*, 2001).

5.3 Encefalitida s protilátkami proti NMDA receptorům

Encefalitida s protilátkami proti NMDA receptorům je autoimunitní onemocnění, při kterém pacient produkuje protilátky proti podjednotce GluN1 NMDA receptoru. Nemoc má několik neurologických symptomů jako například halucinace, psychózy, záchvaty a může skončit smrtí (Dalmau *et al.*, 2007). Oblast aminokyselin N368 a G369 GluN1 podjednotky je klíčová pro vznik imunoreaktivity. V potkaním hipokampu je aminokyselina N368 *N*-glykosylována, avšak tato glykosylace není přímo vyžadována pro vytvoření epitopu. K jeho tvorbě však pravděpodobně přispívá svou konformací (Gleichman *et al.*, 2012).

5.4 Vrozené poruchy glykosylace

Vrozené poruchy glykosylace (CDG) zahrnují přes 100 podtypů genetických poruch, které jsou způsobeny poruchou enzymů zúčastněných v syntéze a vazbě glykanů na další molekuly. Poruchy se týkají tvorby *N*-glykanů, *O*-glykanů, GPI kotvy, biosyntézy

proteoglykanů a glykosylace lipidů. Onemocnění postihuje většinu orgánových soustav, včetně nervového systému. Mezi typické symptomy patří myopatie, mozkové mrtvice, epileptické záchvaty, demyelinizační neuropatie a opožděný vývoj. Defekty *N*-glykosylace jsou rozděleny do dvou skupin. Typ I CDG obsahuje poškození v syntéze a přenesení glykanu z dolicholu na aminokyselinu asparagin. Typ II CDG zahrnuje poškození následného zpracování *N*-glykanu v GA. Velká část těchto poruch vykazuje mozkové dysfunkce, tudíž je možné, že dochází k ovlivnění i iGluRs (Freeze *et al.*, 2012; Freeze *et al.*, 2014).

6 Závěr

Tato práce shrnuje nejnovější poznatky o roli glykosylace iGluRs v CNS savců. Z výsledků studií je patrné, že glykanové struktury a monosacharidy navázané na iGluRs regulují formování funkčních tetramerů v ER a rovněž ovlivňují povrchovou expresi receptorů, včetně jejich synaptické lokalizace. Dále bylo zjištěno, že glykosylace reguluje funkční vlastnosti receptorů, včetně jejich afinity pro agonisty a desensitizace, což je kritické i pro normální fungování bazálního synaptického přenosu. Jelikož studie ukázaly, že glykosylované iGluRs jsou modulovány vazbou přirozeně se vyskytujícími lektiny, které například zpomalují nástup desensitizace nebo modulují kinetiku otevírání iontových kanálů, je zřejmé, že glykosylace je jedním z kritických regulačních faktorů normální funkce glutamatergních synapsí v savčích neuronech.

Glykobiologie je komplexní obor vzhledem k velkému množství známých glykanových struktur a enzymů glykosylačního aparátu v savčích buňkách. Z tohoto důvodu je studium glykosylací velmi náročné a při provádění experimentů je potřeba zvážit vliv mnoha faktorů. Jedním z nich je odlišnost glykanových struktur v závislosti na použití konkrétního expresního systému, díky přítomnosti tkáňově specifických glykosylačních aparátů. Inhibitory glykosylace používané v experimentech mohou také nespecificky ovlivňovat funkci ER a GA, regulační mechanismy nebo životaschopnost buněk. Delece genů kódujících klíčové glykosylační enzymy v některých případech způsobují embryonální letalitu, což komplikuje studium CDG. Výzkum *O*-GlcNAcylation je v porovnání s *N*-glykosylací navíc komplikován nepřítomností konsenzus glykosylačních sekvencí a kompeticí *O*-GlcNAcylation s fosforylací, kvůli modifikaci stejných aminokyselin. Právě díky své komplexnosti může budoucí výzkum různých typů glykosylací přispět k pochopení klíčových regulačních mechanismů a patofyziologických procesů v CNS savců.

Nedávné studie ukázaly, že neurony v savčím mozku obsahují kromě somatického GA i podobnou satelitní sekreční dráhu v distálních dendritech (tzv. Golgiho satelity), která pravděpodobně umožňuje specificky modifikovat dendritické proteiny, včetně synaptických iGluRs. Tento závěr ukazuje, že transportní a glykosylační mechanismy regulující iGluRs jsou vysoce komplexní a regulované na několika úrovních (Pierce *et al.*, 2001; Mikhaylova *et al.*, 2016).

Znalost mechanismů regulace glykosylací může být důležitá pro vývoj nových léčebných postupů pro pacienty s neurologickými a psychiatrickými poruchami, u kterých byla zjištěna abnormální glykosylace proteinů v CNS. U multifaktoriálně podmíněných neuropsychiatrických poruch jako je například schizofrenie je důležité zjistit, zda se poruchy glykosylace proteinů podílejí na vzniku nemoci nebo jsou jejich druhotným projevem. U CDG syndromů, které jsou způsobeny dysfunkcí konkrétních enzymů glykosylačního aparátu, se jeví jako jedna z možností léčba s využitím metody přímé editace genomu tzv. CRISPR, což jsou segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromatických repetitiv, s asociovanou nukleázou Cas (Cong *et al.*, 2013). S rychlým rozvojem molekulárně-biologických metod je předpokládáno, že budou identifikovány dosud neznámé CDG, což dále poukazuje na důležitost studia glykosylací proteinů v CNS včetně iGluRs.

7 Seznam použité literatury

- Aebi, M., 2013. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(11), pp.2430–2437.
- Aebi, M., Bernasconi, R., Clerc, S. & Molinari, M., 2010. N-glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(2), pp.74–82.
- Bhave, G., Nadin, B.M., Brasier, D.J., Glauner, K.S., Shah, R.D., Heinemann, S.F., Karim, F. & Gereau, R.W., 2003. Membrane topology of a metabotropic glutamate receptor. *The Journal of biological chemistry*, 278(32), pp.30294–30301.
- Blackstone, C.D., Moss, S.J., Martin, L.J., Levey, A.I., Price, D.L. & Huganir, R.L., 1992. Biochemical characterization and localization of a non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptor in rat brain. *Journal of neurochemistry*, 58(3), pp.1118–1126.
- Bowie, D., 2008. Ionotropic glutamate receptors & CNS disorders. *CNS & neurological disorders drug targets*, 7(2), pp.129–143.
- Briant, K., Koay, Y.-H., Otsuka, Y. & Swanton, E., 2015. ERAD of proteins containing aberrant transmembrane domains requires ubiquitylation of cytoplasmic lysine residues. *Journal of cell science*, 128(22), pp.4112–4125.
- Brose, N., Gasic, G.P., Vetter, D.E., Sullivan, J.M. & Heinemann, S.F., 1993. Protein chemical characterization and immunocytochemical localization of the NMDA receptor subunit NMDA R1. *Journal of Biological Chemistry*, 268(30), pp.22663–22671.
- Clark, R., Gurd, J.W., Bissoon, N., Tricaud, N., Molnar, E., Zamze, S.E., Dwek, R.A., McIlhinney, R.A. & Wing, D.R., 1998. Identification of lectin-purified neural glycoproteins, GPs 180, 116, and 110, with NMDA and AMPA receptor subunits: conservation of glycosylation at the synapse. *Journal of neurochemistry*, 70(6), pp.2594–2605.
- Coleman, S.K., Möykkynen, T., Cai, C., von Ossowski, L., Kuusimäki, E., Korpi, E.R. & Keinänen, K., 2006. Isoform-specific early trafficking of AMPA receptor flip and flop variants. *The Journal of neuroscience*, 26(43), pp.11220–11229.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A. & Zhang, F., 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), pp.819–823.
- Copits, B.A., Vernon, C.G., Sakai, R. & Swanson, G.T., 2014. Modulation of ionotropic glutamate receptor function by vertebrate galectins. *The Journal of physiology*, 10, pp.2079–2096.
- Cummings, R.D., 2009. The repertoire of glycan determinants in the human glycome. *Molecular BioSystems*, 5(10), pp.1087–1104.

- Curtis, D.R., Phillis, J.W. & Watkins, J.C., 1960. The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. *The Journal of physiology*, 150, pp.656–682.
- Dalmau, J., Tüzün, E., Wu, H., Masjuan, J., Rossi, J.E., Voloschin, A., Baehring, J.M., Shimazaki, H., Koide, R., King, D., Mason, W., Sansing, L.H., Dichter, M.A., Rosenfeld, M.R. & Lynch, D.R., 2007. Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Annals of neurology*, 61(1), pp.25–36.
- Dalpathado, D.S. & Desaire, H., 2008. Glycopeptide analysis by mass spectrometry. *The Analyst*, 133(6), pp.731–738.
- Dennis, J.W., Lau, K.S., Demetriou, M. & Nabi, I.R., 2009. Adaptive regulation at the cell surface by N-glycosylation. *Traffic*, 10(11), pp.1569–1578.
- Ehlers, M.D., Fung, E.T., O'Brien, R.J. & Huganir, R.L., 1998. Splice variant-specific interaction of the NMDA receptor subunit NR1 with neuronal intermediate filaments. *The Journal of neuroscience*, 18(2), pp.720–730.
- Everts, I., Petroski, R., Kizelsztejn, P., Teichberg, V.I., Heinemann, S.F. & Hollmann, M., 1999. Lectin-induced inhibition of desensitization of the kainate receptor GluR6 depends on the activation state and can be mediated by a single native or ectopic N-linked carbohydrate side chain. *The Journal of neuroscience*, 19(3), pp.916–927.
- Everts, I., Villmann, C. & Hollmann, M., 1997. N-Glycosylation Is Not a Prerequisite for Glutamate Receptor Function but Is Essential for Lectin Modulation. *Molecular Pharmacology*, 52(5), pp.861–873.
- Fisher, M.T. & Fisher, J.L., 2014. Contributions of different kainate receptor subunits to the properties of recombinant homomeric and heteromeric receptors. *Neuroscience*, 278, pp.70–80.
- Freeze, H.H., Eklund, E.A., Ng, B.G. & Patterson, M.C., 2012. Neurology of inherited glycosylation disorders. *The Lancet Neurology*, 11(5), pp.453–466.
- Freeze, H.H., Chong, J.X., Bamshad, M.J. & Ng, B.G., 2014. Solving glycosylation disorders: fundamental approaches reveal complicated pathways. *American journal of human genetics*, 94(2), pp.161–175.
- Furmanek, A. & Hofsteenge, J., 2000. Protein C-mannosylation: Facts and questions. *Acta Biochimica Polonica*, 47(3), pp.781–789.
- Gahring, L.C., Carlson, N.G., Meyer, E.L. & Rogers, S.W., 2001. Cutting Edge: Granzyme B Proteolysis of a Neuronal Glutamate Receptor Generates an Autoantigen and Is Modulated by Glycosylation. *The Journal of Immunology*, 166(3), pp.1433–1438.

- Gascón, S., García-Gallo, M., Renart, J. & Díaz-Guerra, M., 2007. Gascon - Endoplasmic reticulum-associated degradation of the NR1 but not the NR2 subunits of the N-methyl-D-aspartate receptor induced by inhibition of the N-glycosylation in cortical neurons. *Journal of neuroscience research*, 85, pp.1713–1723.
- Gleichman, A.J., Spruce, L.A., Dalmau, J., Seeholzer, S.H. & Lynch, D.R., 2012. Anti-NMDA Receptor Encephalitis Antibody Binding Is Dependent on Amino Acid Identity of a Small Region within the GluN1 Amino Terminal Domain. *Journal of Neuroscience*, 32(32), pp.11082–11094.
- Gu, W., Fukuda, T., Isaji, T., Hang, Q., Lee, H., Sakai, S., Morise, J., Mitoma, J., Higashi, H., Taniguchi, N., Yawo, H., Oka, S. & Gu, J., 2015. Loss of α 1,6-Fucosyltransferase Decreases Hippocampal Long Term Potentiation. *The Journal of biological chemistry*, 290(28), pp.17566–17575.
- Hall, R.A., Hansen, A., Andersen, P.H. & Soderling, T.R., 1997. Surface expression of the AMPA receptor subunits GluR1, GluR2, and GluR4 in stably transfected baby hamster kidney cells. *Journal of neurochemistry*, 68(2), pp.625–630.
- Hiraizumi, S., Spohr, U. & Spiro, R.G., 1993. Characterization of endomannosidase inhibitors and evaluation of their effect on N-linked oligosaccharide processing during glycoprotein biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*, 268(13), pp.9927–9935.
- Hollmann, M., Maron, C. & Heinemann, S., 1994. N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron*, 13(6), pp.1331–1343.
- Hsieh, P., Rosner, M.R. & Robbins, P.W., 1983. Host-dependent variation of asparagine-linked oligosaccharides at individual glycosylation sites of Sindbis virus glycoproteins. *The Journal of biological chemistry*, 258(4), pp.2548–2554.
- Huh, K.H. & Wenthold, R.J., 1999. Turnover analysis of glutamate receptors identifies a rapidly degraded pool of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit, NR1, in cultured cerebellar granule cells. *The Journal of biological chemistry*, 274(1), pp.151–157.
- Chazot, P.L., Cik, M. & Stephenson, F.A., 1995. An investigation into the role of N-glycosylation in the functional expression of a recombinant heteromeric NMDA receptor. *Molecular membrane biology*, 12(4), pp.331–337.
- Chazot, P.L. & Stephenson, F.A., 1997. Biochemical evidence for the existence of a pool of unassembled C2 exon-containing NR1 subunits of the mammalian forebrain NMDA receptor. *Journal of neurochemistry*, 68(2), pp.507–516.
- Cheriyian, J., Mezes, C., Zhou, N., Balsara, R.D. & Castellino, F.J., 2015. Heteromerization of ligand binding domains of N-methyl-D-aspartate receptor requires both coagonists, L-glutamate and glycine. *Biochemistry*, 54(3), pp.787–794.

- Jenkins, N., Parekh, R.B. & James, D.C., 1996. Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. *Nature biotechnology*, 14(8), pp.975–981.
- Jiang, J., Suppiramaniam, V. & Wooten, M.W., 2007. Posttranslational modifications and receptor-associated proteins in AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Neuro-Signals*, 15(5), pp.266–282.
- Kanno, T., Yaguchi, T., Nagata, T., Mukasa, T. & Nishizaki, T., 2010. Regulation of AMPA receptor trafficking by O-glycosylation. *Neurochemical Research*, 35(5), pp.782–788.
- Karakas, E., Simorowski, N. & Furukawa, H., 2009. Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit. *The EMBO journal*, 28(24), pp.3910–3920.
- Kawamoto, S., Uchino, S., Hattori, S., Hamajima, K., Mishina, M., Nakajima-Iijima, S. & Okuda, K., 1995. Expression and characterization of the zeta 1 subunit of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor channel in a baculovirus system. *Molecular brain research*, 30(1), pp.137–148.
- Kim, E.J., 2011. Chemical arsenal for the study of O-GlcNAc. *Molecules*, 16(3), pp.1987–2022.
- Kleckner, N.W. & Dingledine, R., 1988. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*, 241(4867), pp.835–837.
- Konrad, R.J., Zhang, F., Hale, J.E., Knierman, M.D., Becker, G.W. & Kudlow, J.E., 2002. Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase. *Biochemical and biophysical research communications*, 293(1), pp.207–212.
- Kumar, J., Schuck, P., Jin, R. & Mayer, M.L., 2009. The N-terminal domain of GluR6-subtype glutamate receptor ion channels. *Nature structural & molecular biology*, 16(6), pp.631–638.
- Lau, C.G. & Zukin, R.S., 2007. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(6), pp.413–426.
- Lichnerova, K., Kaniakova, M., Park, S.P., Skrenkova, K., Wang, Y.X., Petralia, R.S., Suh, Y.H. & Horak, M., 2015. Two N-glycosylation sites in the GluN1 subunit are essential for releasing N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors from the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 290(30), pp.18379–18390.
- Lis, H. & Sharon, N., 1993. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *European journal of biochemistry / FEBS*, 218(1), pp.1–27.
- Llansola, M., Sanchez-Perez, A., Cauli, O. & Felipo, V., 2005. Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. II. Signaling pathways and physiological modulators regulating NMDA receptor function. *Cerebellum*, 4(3), pp.162–170.

- Lu, W., Shi, Y., Jackson, A.C., Bjorgan, K., During, M.J., Sprengel, R., Seeburg, P.H. & Nicoll, R.A., 2009. Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. *Neuron*, 62(2), pp.254–268.
- Mah, S.J., 2005. Glutamate Receptor Trafficking: Endoplasmic Reticulum Quality Control Involves Ligand Binding and Receptor Function. *Journal of Neuroscience*, 25(9), pp.2215–2225.
- Maruo, K., Nagata, T., Yamamoto, S., Nagai, K., Yajima, Y., Maruo, S. & Nishizaki, T., 2003. Tunicamycin inhibits NMDA and AMPA receptor responses independently of N-glycosylation. *Brain Research*, 977(2), pp.294–297.
- Maruo, K., Yamamoto, S., Kanno, T., Yaguchi, T., Maruo, S., Yashiya, S. & Nishizaki, T., 2006. Tunicamycin decreases the probability of single-channel openings for N-methyl-D-aspartate and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors. *Neuroreport*, 17(3), pp.313–317.
- Meyerson, J.R., Kumar, J., Chittori, S., Rao, P., Pierson, J., Bartesaghi, A., Mayer, M.L. & Subramaniam, S., 2014. Structural mechanism of glutamate receptor activation and desensitization. *Nature*, 514(7522), pp.328–334.
- Migliore, M., De Simone, G. & Migliore, R., 2015. Effect of the initial synaptic state on the probability to induce long-term potentiation and depression. *Biophysical Journal*, 108(5), pp.1038–1046.
- Mikhaylova, M., Bera, S., Kobler, O., Frischknecht, R. & Kreutz, M.R., 2016. A Dendritic Golgi Satellite between ERGIC and Retromer. *Cell reports*, 14(2), pp.189–199.
- Molinari, M., Eriksson, K.K., Calanca, V., Galli, C., Cresswell, P., Michalak, M. & Helenius, A., 2004. Contrasting Functions of Calreticulin and Calnexin in Glycoprotein Folding and ER Quality Control. *Molecular Cell*, 13(1), pp.125–135.
- Moremen, K.W., Tiemeyer, M. & Nairn, A. V., 2012. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(7), pp.448–462.
- Mothet, J.P., Parent, A.T., Wolosker, H., Brady, R.O., Linden, D.J., Ferris, C.D., Rogawski, M.A. & Snyder, S.H., 2000. D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9), pp.4926–4931.
- Nakato, R., Ohkubo, Y., Konishi, A., Shibata, M., Kaneko, Y., Iwawaki, T., Nakamura, T., Lipton, S.A. & Uehara, T., 2015. Regulation of the unfolded protein response via S-nitrosylation of sensors of endoplasmic reticulum stress. *Scientific Reports*, 5.

- Nanao, M.H., Green, T., Stern-Bach, Y., Heinemann, S.F. & Choe, S., 2005. Structure of the kainate receptor subunit GluR6 agonist-binding domain complexed with domoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5), pp.1708–1713.
- Niciu, M.J., Kelmendi, B. & Sanacora, G., 2012. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 100(4), pp.656–664.
- Niswender, C.M. & Conn, P.J., 2010. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 50, pp.295–322.
- Ong, Y.S., Tran, T.H.T., Gounko, N. V & Hong, W., 2014. TMEM115 is an integral membrane protein of the Golgi complex involved in retrograde transport. *Journal of cell science*, 127(13), pp.2825–2839.
- Orth, A., Tapken, D. & Hollmann, M., 2013. The delta subfamily of glutamate receptors: Characterization of receptor chimeras and mutants. *European Journal of Neuroscience*, 37(10), pp.1620–1630.
- Owens, G.C., Chang, J.W., Huynh, M.N., Chirwa, T., Vinters, H. V. & Mathern, G.W., 2016. Evidence for Resident Memory T Cells in Rasmussen Encephalitis. *Frontiers in immunology*, 7, p.64.
- Pasternack, A., Coleman, S.K., Féthière, J., Madden, D.R., LeCaer, J.-P., Rossier, J., Pasternack, M. & Keinänen, K., 2003. Characterization of the functional role of the N-glycans in the AMPA receptor ligand-binding domain. *Journal of neurochemistry*, 84(5), pp.1184–1192.
- Pathak, S., Alonso, J., Schimpl, M., Rafie, K., Blair, D.E., Borodkin, V.S., Schüttelkopf, A.W., Albarbarawi, O. & van Aalten, D.M.F., 2015. The active site of O-GlcNAc transferase imposes constraints on substrate sequence. *Nature structural & molecular biology*, 22(9), pp.744–750.
- Pentikäinen, O.T., Settimo, L., Keinänen, K. & Johnson, M.S., 2003. Selective agonist binding of (S)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolyl)propionic acid (AMPA) and 2S-(2 α ,3 β ,4 β)-2-carboxy-4-(1-methylethenyl)-3-pyrrolidineacetic acid (kainate) receptors: a molecular modeling study. *Biochemical Pharmacology*, 66(12), pp.2413–2425.
- Pierce, J.P., Mayer, T. & McCarthy, J.B., 2001. Evidence for a satellite secretory pathway in neuronal dendritic spines. *Current biology*, 11(5), pp.351–355.
- Rubio, M.D., Drummond, J.B. & Meador-Woodruff, J.H., 2012. Glutamate receptor abnormalities in schizophrenia: Implications for innovative treatments. *Biomolecules and Therapeutics*, 20(1), pp.1–18.

- Saglietti, L., Dequidt, C., Kamieniarz, K., Rousset, M.-C., Valnegri, P., Thoumine, O., Beretta, F., Fagni, L., Choquet, D., Sala, C., Sheng, M. & Passafaro, M., 2007. Extracellular interactions between GluR2 and N-cadherin in spine regulation. *Neuron*, 54(3), pp.461–477.
- Salussolia, C.L., Gan, Q., Kazi, R., Singh, P., Allopenna, J., Furukawa, H. & Wollmuth, L.P., 2013. A eukaryotic specific transmembrane segment is required for tetramerization in AMPA receptors. *The Journal of neuroscience*, 33(23), pp.9840–9845.
- Seal, A.J., Collingridge, G.L. & Henley, J.M., 1995. An investigation of the membrane topology of the ionotropic glutamate receptor subunit GluR1 in a cell-free system. *The Biochemical journal*, 312, pp.451–456.
- Schauder, D.M., Kuybeda, O., Zhang, J., Klymko, K., Bartesaghi, A., Borgnia, M.J., Mayer, M.L. & Subramaniam, S., 2013. Glutamate receptor desensitization is mediated by changes in quaternary structure of the ligand binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(15), pp.5921–5926.
- Schwarz, F. & Aebi, M., 2011. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*, 21(5), pp.576–582.
- Silberstein, S. & Gilmore, R., 1996. Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(8), pp.849–858.
- Simpson, H.B., Shungu, D.C., Bender, J., Mao, X., Xu, X., Slifstein, M. & Kegeles, L.S., 2012. Investigation of Cortical Glutamate–Glutamine and γ -Aminobutyric Acid in Obsessive–Compulsive Disorder by Proton Magnetic Resonance Spectroscopy. *Neuropsychopharmacology*, 37(12), pp.2684–2692.
- Sobolevsky, A.I., 2015. Structure and gating of tetrameric glutamate receptors. *The Journal of physiology*, 593(1), pp.29–38.
- Sobolevsky, A.I., Rosconi, M.P. & Gouaux, E., 2009. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature*, 462(7274), pp.745–756.
- Sreelatha, A., Kinch, L.N. & Tagliabracci, V.S., 2015. The secretory pathway kinases. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1854(10), pp.1687–1693.
- Standley, S. & Baudry, M., 2000. The role of glycosylation in ionotropic glutamate receptor ligand binding, function, and trafficking. *Cellular and molecular life sciences*, 57(11), pp.1508–1516.
- Standley, S., Tocco, G., Wagle, N. & Baudry, M., 1998. High- and low-affinity alpha-[3H]amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid ([3H]AMPA) binding sites represent immature and mature forms of AMPA receptors and are composed of differentially glycosylated subunits. *Journal of neurochemistry*, 70(6), pp.2434–2445.

- Stanley, P., 2011. Golgi glycosylation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4), pp.1–13.
- Stern-Bach, Y., Bettler, B., Hartley, M., Sheppard, P.O., O'Hara, P.J. & Heinemann, S.F., 1994. Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron*, 13(6), pp.1345–1357.
- Storey, G., Opitz-Araya, X. & Barria, A., 2011. Molecular determinants controlling NMDA receptor synaptic incorporation. *The Journal of neuroscience*, 31(17), pp.6311–6316.
- Stroebel, D., Carvalho, S., Grand, T., Zhu, S. & Paoletti, P., 2014. Controlling NMDA receptor subunit composition using ectopic retention signals. *The Journal of neuroscience*, 34(50), pp.16630–16636.
- Swatek, K.N. & Komander, D., 2016. Ubiquitin modifications. *Cell research*, 26(4), pp.399–422.
- Takeuchi, Y., Morise, J., Morita, I., Takematsu, H. & Oka, S., 2015. Role of site-specific N-glycans expressed on GluA2 in the regulation of cell surface expression of AMPA-type glutamate receptors. *PLoS ONE*, 10(8), pp.1–14.
- Taverna, F.A., Wang, L.Y., MacDonald, J.F. & Hampson, D.R., 1994. A transmembrane model for an ionotropic glutamate receptor predicted on the basis of the location of asparagine-linked oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry*, 269(19), pp.14159–14164.
- Taylor, E.W., Wang, K., Nelson, A.R., Bredemann, T.M., Fraser, K.B., Clinton, S.M., Puckett, R., Marchase, R.B., Chatham, J.C. & McMahon, L.L., 2014. O-GlcNAcylation of AMPA receptor GluA2 is associated with a novel form of long-term depression at hippocampal synapses. *The Journal of neuroscience*, 34(1), pp.10–21.
- Thalhammer, A., Everts, I. & Hollmann, M., 2002. Inhibition by lectins of glutamate receptor desensitization is determined by the lectin's sugar specificity at kainate but not AMPA receptors. *Molecular and cellular neurosciences*, 21(4), pp.521–533.
- Traynelis, S.F., 2010. Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological reviews*, 14(1), pp.405–496.
- Tucholski, J., Pinner, A.L., Simmons, M.S. & Meador-Woodruff, J.H., 2014. Evolutionarily conserved pattern of AMPA receptor subunit glycosylation in Mammalian frontal cortex. *PloS one*, 9(4), pp.942–955.
- Tucholski, J., Simmons, M.S., Pinner, A.L., Haroutunian, V., McCullumsmith, R.E. & Meador-Woodruff, J.H., 2013. Abnormal N-linked glycosylation of cortical AMPA receptor subunits in schizophrenia. *Schizophrenia research*, 146(1-3), pp.177–183.

- Tucholski, J., Simmons, M.S., Pinner, A.L., McMillan, L.D., Haroutunian, V. & Meador-Woodruff, J.H., 2013. N-linked glycosylation of cortical N-methyl-D-aspartate and kainate receptor subunits in schizophrenia. *Neuroreport*, 24(12), pp.688–691.
- Ueda, T., Nakamura, Y., Smith, C.M., Copits, B.A., Inoue, A., Ojima, T., Matsunaga, S., Swanson, G.T. & Sakai, R., 2013. Isolation of novel prototype galectins from the marine ball sponge *Cinachyrella* sp. guided by their modulatory activity on mammalian glutamate-gated ion channels. *Glycobiology*, 23(4), pp.412–425.
- Vagin, O., Kraut, J.A. & Sachs, G., 2009. Role of N-glycosylation in trafficking of apical membrane proteins in epithelia. *American journal of physiology. Renal physiology*, 296(3), pp.F459–F469.
- Vermeire, K., Bell, T.W., Van Puyenbroeck, V., Giraut, A., Noppen, S., Liekens, S., Schols, D., Hartmann, E., Kalies, K.U. & Marsh, M., 2014. Signal Peptide-Binding Drug as a Selective Inhibitor of Co-Translational Protein Translocation. *PLoS Biology*, 12(12).
- La Via, L., Bonini, D., Russo, I., Orlandi, C., Barlati, S. & Barbon, A., 2013. Modulation of dendritic AMPA receptor mRNA trafficking by RNA splicing and editing. *Nucleic Acids Research*, 41(1), pp.617–631.
- Wang, Y.-C., Peterson, S.E. & Loring, J.F., 2014. Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell research*, 24(2), pp.143–160.
- Watkins, J.C. & Evans, R.H., 1981. Excitatory amino acid transmitters. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 21, pp.165–204.
- Wood, M.W., VanDongen, H.M. & VanDongen, A.M., 1995. Structural conservation of ion conduction pathways in K channels and glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(11), pp.4882–4886.
- Yamamoto, H., Hagino, Y., Kasai, S. & Ikeda, K., 2015. Specific Roles of NMDA Receptor Subunits in Mental Disorders. *Current molecular medicine*, 15(3), pp.193–205.
- Yao, H., Li, A. & Wang, M., 2015. Systematic Analysis and Prediction of In Situ Cross Talk of O-GlcNAcylation and Phosphorylation. *BioMed Research International*, 2015, pp.1–12.
- Yuan, H., Hansen, K.B., Vance, K.M., Ogden, K.K. & Traynelis, S.F., 2009. Control of NMDA receptor function by the NR2 subunit amino-terminal domain. *The Journal of neuroscience*, 29(39), pp.12045–12058.
- Zhao, H., Berger, A.J., Brown, P.H., Kumar, J., Balbo, A., May, C.A., Casillas, E., Laue, T.M., Patterson, G.H., Mayer, M.L. & Schuck, P., 2012. Analysis of high-affinity assembly for AMPA receptor amino-terminal domains. *The Journal of general physiology*, 139(5), pp.371–388.

Zielinska, D.F., Gnad, F., Wiśniewski, J.R. & Mann, M., 2010. Precision Mapping of an In Vivo N-Glycoproteome Reveals Rigid Topological and Sequence Constraints. *Cell*, 141(5), pp.897–907.